

на правах рукописи

ЗУБЦОВ Дмитрий Александрович

**КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА АНТИГЕН-АНТИТЕЛО
НА МИКРОЧИПАХ**

03.00.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Лаборатории биологических микрочипов Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН и на кафедре молекулярной биофизики МФТИ (ГУ).

Научные руководители:

кандидат химических наук

А. Ю. Рубина

доктор физико-математических наук

М.А. Лившиц

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук

А. А. Полежаев (ФИАН)

доктор физико-математических наук

Р. В. Полозов (ИТЭБ)

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков

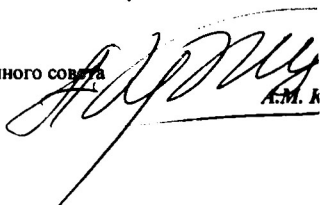
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 13.11 2008 г. в 12⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН по адресу 119991 г. Москва, В-334, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

Автореферат разослан 10 октября 2008г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук


А.М. К

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000429020

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Биологические микрочипы становятся все более востребованным и эффективным аналитическим инструментом для фундаментальных и прикладных молекулярно-биологических исследований. Микрочипы содержат упорядоченно размещенные биомолекулярные зонды, которые либо непосредственно прикреплены к поверхности носителя, такого как стекло, пластик, металл, и др. (2D-микрочип), либо иммобилизованы в объеме гидрогелевых ячеек, закрепленных на носителе (3D-микрочип). Технология изготовления трехмерных гидрогелевых микрочипов с использованием в качестве зондов ДНК-олигонуклеотидов, белков и сахаров разработана в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН. Трехмерное размещение молекулярных зондов способно обеспечить ряд преимуществ по сравнению с поверхностной иммобилизацией. Для белковых микрочипов особенно важным является устранение контакта иммобилизованной белковой молекулы с гидрофобной поверхностью подложки. Также важно иметь возможность многократного повышения уровней регистрируемых сигналов за счет увеличения количества зонда, приходящегося на единицу площади ячейки. Вместе с тем опасения могла бы внушать ожидаемая медленность кинетики, типичная в случае олигонуклеотидных гелевых микрочипов и обусловленная механизмом «задержанной диффузии» (Livshits, Mirzabekov 1996). Однако наше исследование показывает, что в условиях динамических концентраций антигена используемых в клинических исследованиях, использования белковых микрочипов кинетика лимитируется «внешней» диффузией в объеме, окружающем ячейку, и потому одинакова для 3D- и 2D-микрочипов. Выявленный кинетический механизм образования комплекса антиген-антитело делает осмысленной задачу ускорения реакций проводимых на белковых микрочипах посредством принудительного перемешивания раствора. Задача ускорения реакции образования комплекса антиген-антитело мотивирована не только удобством для практического использования данного метода анализа на микрочипах, но и возможностью значительного повышения его разрешающей способности.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью исследования являлось изучение кинетики образования комплекса антиген-антитело на гидрогелевых микрочипах, получение данных об основных параметрах, влияющих на время достижения насыщения и на уровни сигналов в насыщении для оптимизации иммуноанализа на микрочипах.

В связи с этим были поставлены следующие задачи

1. Сравнить гидрогелевые микрочипы (3D) с поверхностными микрочипами (2D), оценивая основные функциональные параметры:

- a. эффективность иммобилизации
 - b. уровни сигналов в сэндвич-иммуноанализе (тройной комплекс)
 - c. времена выхода на насыщение и интенсивности сигналов в насыщении (двойной комплекс)
2. Изучить кинетику реакции антиген-антитело на гидрогелевых микрочипах и возможности ускорения реакции перемешиванием раствора
 - a. исследовать концентрационные зависимости времени выхода на насыщение и уровней сигналов в насыщении;
 - b. исследовать кинетический эффект принудительного перемешивания раствора;
 - c. сопоставить полученные данные с теорией.
3. Оценить практическую значимость опробованных методов ускорения реакции антиген-антитело на микрочипах

НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

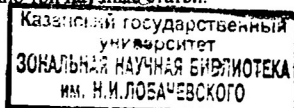
Исследована кинетика образования комплекса антиген-антитело на микрочипах с антителами, иммобилизованными в гелевых ячейках и на микрочипах с антителами, ковалентно пришитыми к стеклянной подложке. Определены основные функциональные параметры, влияющие на время достижения насыщения и на уровни сигналов для двух типов микрочипов. Проведено сравнительное исследование гидрогелевых и поверхностных белковых микрочипов. Показано, что преимущество гидрогелевых белковых микрочипов перед поверхностными в уровнях сигналов может достигать нескольких порядков. Обнаружено, что кинетика иммунохимических реакций на микрочипе лимитируется (внешней) диффузией исследуемых биологических объектов в растворе к ячейке микрочипа и потому одинакова для поверхностных и трехмерных гелевых микрочипов. Проведенные исследования и выявленные закономерности позволили предложить способ ускорения процедуры иммуноанализа на микрочипах, сократить время проведения анализа в 4-5 раз без потери чувствительности, что найдет применение при разработке иммунодиагностических тест-систем на основе технологии гидрогелевых микрочипов.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты работы докладывались на 49-й и 50-й Научных конференциях МФТИ (27 ноября 2006 г. и 27 ноября 2007 г., Москва) и на научных семинарах ИМБ РАН.

ПУБЛИКАЦИИ

По результатам диссертации опубликовано три научные статьи.



ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение; выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 90 страницах машинописного текста, содержит 19 рисунков и 2 таблицы. Библиография включает 122 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Белковые микрочипы

Белковые микрочипы используются для исследования белок-белковых, белок-лигандных взаимодействий, для проведения ферментативных реакций, а также в аналитических целях. Высокая производительность анализа на белковых микрочипах делает перспективным их использование в медицине в качестве миниатюрных аналитических систем для проведения многопараметрического анализа клинических образцов.

Технологии производства белковых микрочипов развиваются десятками фирм, например Biacore (Швеция), Ciphergen Biosystems (США), Oxford GlykoSciences (Великобритания) и др. Тем не менее, до сих пор не предложено удовлетворительной технологии массового производства белковых микрочипов для клинической практики.

Одна из трудностей при создании белковых микрочипов состоит в том, что для сохранения структуры и биологических функций белковые молекулы нуждаются в гидрофильном окружении, максимально приближенном к естественным условиям функционирования белков. Хотя разработан целый ряд способов иммобилизации белков на поверхности носителя, указанное ограничение препятствует созданию устойчиво работающих и долго хранящихся поверхностных белковых микрочипов.

При изготовлении микрочипов существенна природа иммобилизуемых белков – чем однороднее структура белков, тем проще и воспроизводимее процедура их иммобилизации. Моноклональные антитела, используемые в большинстве диагностических методов, в том числе в иммуоферментном и иммунофлуоресцентном анализе, обладают требуемыми свойствами. Они довольно устойчивы и обладают высокой специфичностью к антигенам. Микрочипы с панелями иммобилизованных моноклональных антител, позволяющие проводить многопараметрический анализ клинических образцов, могли бы найти широкое применение в медицинской практике.

Для иммобилизации белковых молекул на поверхности носителя применяют различные физические и химические методы. В данной работе для получения двумерных микрочипов

поверхность стеклянных слайдов обрабатывали (3-глицидилоксипропил)-триметоксисилоном. Эпоксидирование слайда даёт возможность получать спейсер, отделяющий белок от носителя, это имеет значение для уменьшения потери исходной активности белка за счет стерических затруднений, возникающих в результате иммобилизации.

Трёхмерные белковые микрочипы изготавливали по технологии полимеризационной иммобилизации, разработанной в Лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН. Разработанная технология гидрогелевых микрочипов достаточно универсальна и может быть применена для изготовления чипов, содержащих различные по своей природе иммобилизованные биологические зонды: ДНК, РНК, белки, пептиды и пр. Гидрогелевые микрочипы уже используются для диагностики целого ряда инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний.

Биочип представляет собой подложку, на которую нанесены полусферические гелевые элементы (ячейки). Каждый гелевый элемент микрочипа содержит иммобилизованный индивидуальный зонд. Носителем для размещения гидрогелевых ячеек служат стеклянные пластинки, обработанные специальным агентом (Bind Silane), создающим на поверхности стекла непредельные группы. На активированное таким образом стекло роботом с пиновой технологией наносятся микрокапли полимеризационной смеси, содержащей иммобилизуемые зонды и гелеобразующие мономеры. В итоге получается гидрофобная поверхность с массивом регулярно расположенных ячеек. Число ячеек на микрочипе определяются задачей и условиями планируемого эксперимента.

Ковалентная иммобилизация молекул зонда осуществляется одновременно с полимеризацией геля под действием ультрафиолетового облучения (Рис. 1). В ходе фотоиндуцируемой полимеризации происходит ковалентное связывание зонда с компонентами растущих полимерных цепей.

Для того, чтобы участвовать в реакции фотоиндуцируемой полимеризации, биологические соединения должны содержать активные группы, способные вступать в реакции замещения или присоединения с бифункциональными гелеобразующими мономерами. В качестве таких активных групп могут выступать, например, аминогруппы. Белки не требуют дополнительной химической модификации, в то время как ДНК, олигонуклеотиды и сахара перед проведением иммобилизации необходимо модифицировать введением в их структуру аминогрупп. В качестве гелеобразующих соединений в нашей работе использовали производные метакриламида и N,N-метиленисакриламид.



Рисунок 1. Получение ячеек гидрогеля, содержащих молекулярный зонд, методом фотоиндуцированной сополимеризации.

Регистрация сигналов гелевых ячеек микрочипа

Регистрацию осуществляли флуориметрически с гелевых элементов микрочипа. Белки, используемые для детекции, содержали флуоресцентную метку. В качестве красителей использовали сукцинимидные эфиры Cy3 и Cy5 (Amersham Biosciences, США). Флуоресцентные измерения проводили на анализаторе биочипов (ИМБ РАН) с использованием фильтров 650/670 (Cy5) нм и 535/590нм (Cy3) (возбуждение/регистрация). Расчет интенсивности флуоресцентного сигнала производили с помощью программного обеспечения ImaGelAssay (ИМБ РАН). Кинетические измерения проводили в камере, под буферным раствором, содержащим флуоресцентно-меченные белки.

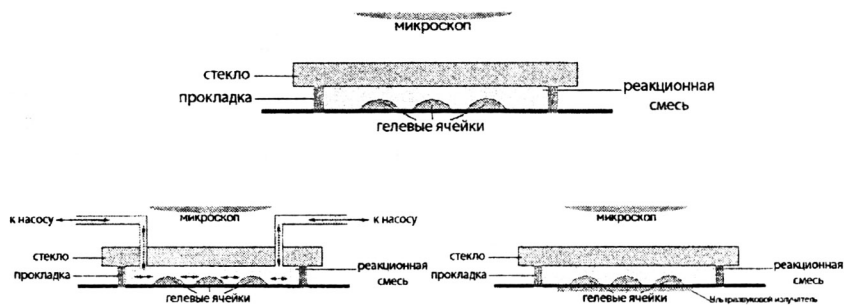


Рисунок 2. Схематическое изображение микрочипов под камерой с реакционным раствором. Схематическое изображение перемешивания при помощи перистальтического насоса и ультразвука.

Объекты исследования

Простата-специфический антиген (ПСА)

ПСА продуцируется клетками предстательной железы и представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 32 кДа. При поступлении в кровь ПСА связывается с ингибиторами протеаз, в результате чего в сыворотке крови он обнаруживается как в свободной форме, так и в различных связанных молекулярных формах, не обладающих специфической ферментативной активностью: преимущественно в комплексе с антитрипсином (АХТ) — ПСА-АХТ. Высокая клиническая значимость ПСА как диагностического маркера побудила лабораторию биочипов ИМБ создать специальный микрочип для одновременного количественного определения двух форм ПСА. Такой микрочип может найти применение для ранней дифференциальной диагностики рака предстательной железы и для соответствующего массового обследования населения.

Для проведения данного исследования были созданы поверхностные и гидрогелевые микрочипы с иммобилизованными антителами против ПСА. Использованный набор концентраций иммобилизуемых антител: 0,67 мкМ (1), 1,34 мкМ (2), 2,68 мкМ (3), 5,36 мкМ (4).

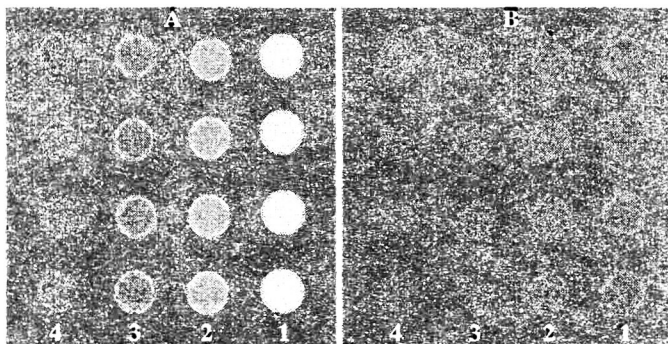


Рисунок 3. Флуоресцентное изображение трехмерных (А) и двумерных (В) микрочипов после проведения иммуноанализа. Каждая концентрация иммобилизованных антител (1-4) представлена в 4-х повторях. Сигнал для каждой концентрации иммобилизованных антител считается как медиана от четырех.

Для определения эффективности иммобилизации были сконструированы поверхностные и гидрогелевые микрочипы с иммобилизованными флуоресцентно-

меченными (Cy5) антителами. Использованный набор концентраций иммобилизуемых антител: 0,97 мкМ, 1,94 мкМ, 3,88 мкМ, 7,76 мкМ, 15,53 мкМ

Инсулин

Инсулин – гормон пептидной природы с молекулярной массой 6 кДа, образующийся в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Инсулин имеет отношение ко всем видам обмена веществ в организме, и, прежде всего к обмену углеводов. Инсулин и антитела к нему составляют систему, весьма удобную для экспериментальных исследований, благодаря небольшим размерам молекулы инсулина и хорошей константе связывания ($5 \cdot 10^7 M^{-1}$). Был создан микрочип с иммобилизованными антителами против инсулина. Использованный набор концентраций иммобилизуемых антител: 0,2 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 4 мкМ

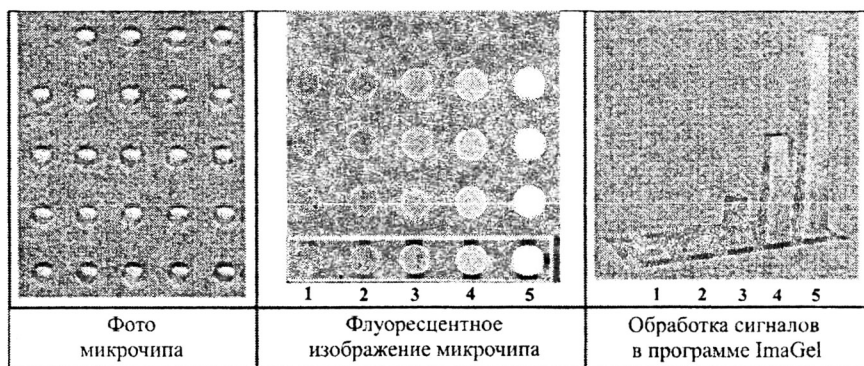


Рисунок 4. Фото микрочипа в проходящем свете, флуоресцентное изображение микрочипа после проведения анализа, уровни флуоресцентных сигналов после обработки в программе ImaGel. Каждая концентрация иммобилизованных антител (1-5) представлена в 4-х повторах. Сигнал для каждой концентрации иммобилизованных антител считается как медиана от четырех.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение эффективности иммобилизации в двух системах

Для определения эффективности иммобилизации использовали микрочипы с иммобилизованными флуоресцентно-меченными (Cy5) антителами. Уровень флуоресцентного сигнала после завершения сополимеризации (гидрогелевые микрочипы) или ковалентной иммобилизации (поверхностные микрочипы), до отмывки от непрореагировавших компонентов принимали за 100%. Продолжительность отмывки

подбиралась по установлению постоянного сигнала. Эффективность иммобилизации оценивалась как отношение сигналов, полученных после отмывки микрочипов к исходным сигналам, то есть до отмывки.

Из рисунка 5 видно, что для гидрогелевых микрочипов эффективность иммобилизации практически не меняется с увеличением концентрации иммобилизуемых антител, в то время как на поверхностных микрочипах заметно падает.

Нижеследующие оценки дают объяснение падению эффективности иммобилизации на 2D микрочипах при высоких концентрациях иммобилизуемых антител.

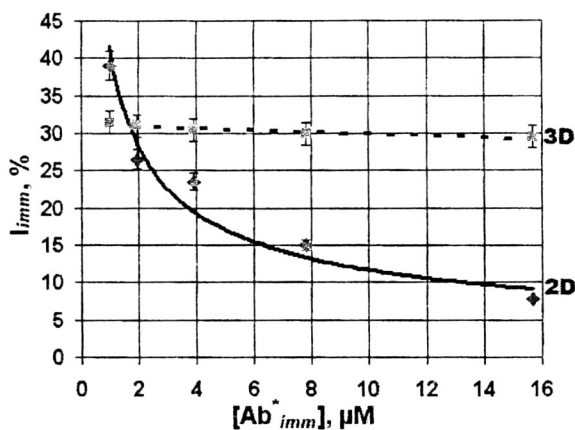


Рисунок 5. Зависимость эффективности иммобилизации флуоресцентно-меченных антител от концентрации иммобилизуемых антител. 3D – гидрогелевые микрочипы, 2D – поверхностные микрочипы.

Количество антител на единицу площади ячейки и среднее расстояние между антителами

Количество антител, проходящее на единицу площади ячейки микрочипа, оценивается по количеству наносимого материала и размерам ячеек (диаметр 150 мкм) с поправкой на ограниченную эффективность иммобилизации. Определенная таким образом эффективная поверхностная плотность составляет: для двумерных микрочипов $1.1 \times 10^{-12} - 3.3 \times 10^{-12}$ мол/см², а для трехмерных гидрогелевых микрочипов $1.3 \times 10^{-12} - 21.3 \times 10^{-12}$ мол/см². В случае гидрогелевых микрочипов такая эффективная поверхностная плотность соответствует как бы вертикальной проекции объемного распределения антител в гелевой ячейке на площадку прикреплению.

Из графиков видно (рис. 6), что на поверхностных микрочипах при увеличении концентрации иммобилизуемых антител достигается предельное значение плотности антител на единицу площади ячейки. Оценка средних расстояний между антителами (рис. 7), связанными на поверхности $d_{surf} = [\tilde{A} \tilde{b}_i]^{-1/2} \sim 9,4 - 5,5$ нм показывает, что предел плотности посадки на поверхности, видимо, соответствует заполненному мономолекулярному слою антител. (Считается, что размеры молекул моноклональных антител $\sim 7-10$ нм) Между тем в случае гелевого 3D-микрочипа среднее расстояние между молекулами антител $d_{gel} = [Ab_i]^{-1/3} \sim 178,5 - 70,8$ нм гораздо больше молекулярных размеров.

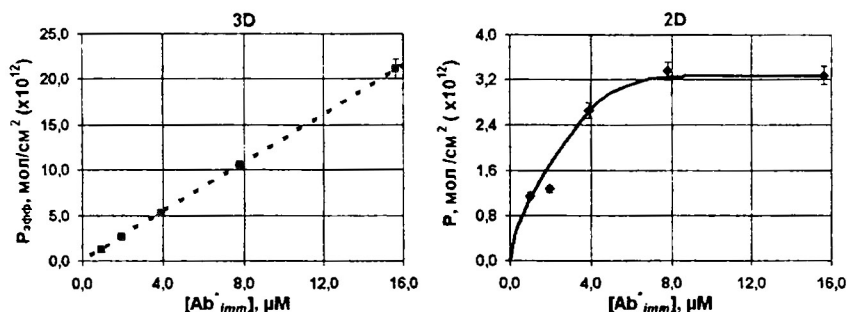


Рисунок 6. 3D – зависимость эффективной поверхностной плотности антител от концентрации иммобилизуемых антител на гидрогелевых микрочипах, 2D – зависимость эффективной поверхностной плотности антител от концентрации иммобилизуемых антител на поверхностных микрочипах.

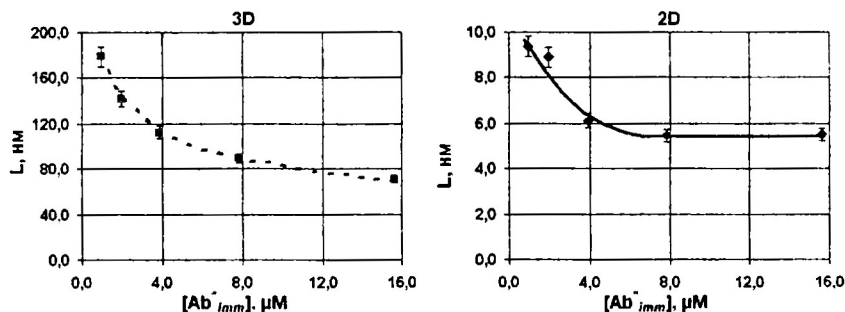


Рисунок 7. Зависимости среднего расстояния между иммобилизованными антителами от концентрации иммобилизуемых антител. 3D – гидрогелевые микрочипы, 2D – поверхностные микрочипы.

Следует подчеркнуть, что в описываемых сравнительных исследованиях мы намеренно использовали для иммобилизации на 3D- и 2D-микрочипах одинаковые количества антител на ячейку. Для реальных приложений в гелевые ячейки 3D-микрочипов можно поместить гораздо большие количества антител.

Сравнение поверхностных и гидрогелевых микрочипов по уровням сигналов в сэндвич-иммуноанализе

Для сравнения уровней сигнала в сэндвич-иммуноанализе на 2D- и 3D-микрочипах были использованы микрочипы с иммобилизованными антителами против ПСА. Были получены калибровочные кривые для каждого значения концентрации иммобилизуемых антител в сэндвич-иммуноанализе на двух видах микрочипов. Калибровочная кривая - основной инструмент при проведении количественного иммуноанализа. Она представляет собой зависимость интенсивности сигнала от концентрации антигена в растворе. Этот график служит для определения неизвестной концентрации антигена в исследуемом образце.

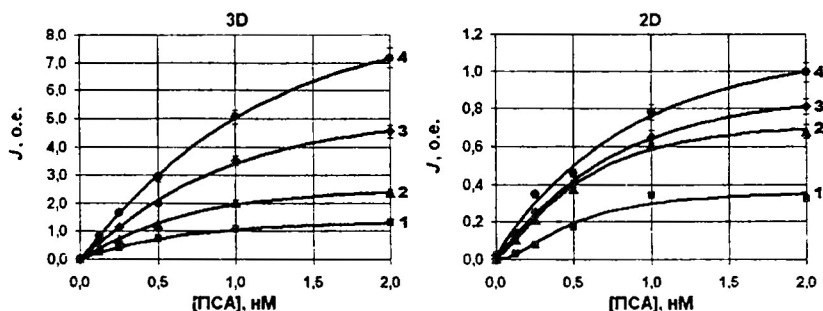


Рисунок 8. Калибровочные кривые: интенсивность сигнала в зависимости от концентрации антигена. Концентрации иммобилизуемых антител против ПСА соответственно равны 0,67 мкМ (1), 1,34 мкМ (2), 2,68 мкМ (3), 5,36 мкМ (4).

Как видно из рисунка 8, на форму калибровочной кривой влияет также концентрация иммобилизованных антител. В таблице 1 представлены уровни сигнала при максимальном значении концентрации ПСА в растворе, а также их отношения для двух видов микрочипов в зависимости от концентрации иммобилизуемых антител.

При малых концентрациях антител преимущество гидрогелевых микрочипов обусловлено отсутствием денатурации белков благодаря исключению контактов с гидрофобной поверхностью подложки. При увеличении концентрации иммобилизуемых антител разницу в уровнях сигналов увеличивает также и падение эффективности иммобилизации на поверхностных микрочипах.

Для реальных приложений иммуноанализа на микрочипах возможность увеличения

количества антител, иммобилизованных в каждой ячейке, играет весьма важную роль. Дело не только в повышении уровней сигналов. Связанное с этим увеличение угла наклона калибровочной кривой означает повышение чувствительности метода. Чувствительность определяется дискриминацией между «нулевым» сигналом, то есть сигналом в отсутствии антигена в образце, и значимым сигналом (значимым сигналом считается значение сигнала, вдвое превышающее значение сигнала в отсутствии антигена) для данной концентрации иммобилизованных антител. Из рисунков видно, что на гидрогелевом микрочипе такая дискриминация значительно эффективнее.

Таблица 1: Значение уровней сигналов при максимальном значении концентрации ПСА в растворе. Отношение уровней сигналов полученных на гидрогелевых микрочипах к сигналам полученным на поверхностных микрочипах.

№	4	3	2	1
$[Ab_{\text{неч}}], \mu\text{M}$	0.67	1.34	2.68	5.36
J_{3D}	1.31	2.38	4.55	7.16
J_{2D}	0.32	0.55	0.81	0.99
J_{3D} / J_{2D}	4.1	4.3	5.6	7.2

Кинетика реакции антиген-антитело на микрочипах

Исследовалась кинетика связывания флуоресцентно-меченного антигена (ПСА) в концентрации 25нМ, с иммобилизованными антителами против ПСА в случае двумерных и трехмерных микрочипов.

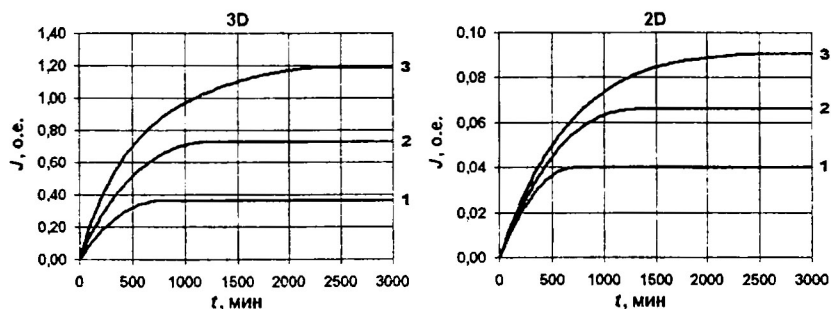


Рисунок 9. Зависимости сигнала от времени, полученные в результате взаимодействия иммобилизованных антител с флуоресцентно-меченным антигеном (ПСА), концентрация которого составляла 25нМ. Концентрации иммобилизуемых антител к ПСА соответственно равны 1,34 мкМ (1), 2,68 мкМ (2), 5,36 мкМ (3)

В кинетических экспериментах измерения меняющихся флуоресцентных сигналов от ячеек микрочипа производятся без удаления из камеры раствора меченного антигена.

Оказалось, что при таких измерениях сквозь флуоресцирующий раствор в случае двумерного микрочипа сигналы от ячеек с наименьшей концентрацией иммобилизованных антител почти не отличаются от фонового сигнала даже при использованной довольно высокой концентрации антигена. Поэтому мы отказались от сравнения кинетических данных, относящихся к наименьшей концентрации иммобилизуемых антител (рис. 9).

Сравнение уровней сигналов в насыщении и характерного времени реакции (как времени достижения 90%-ного уровня сигнала) для двух видов микрочипов представлено на рисунке 10.

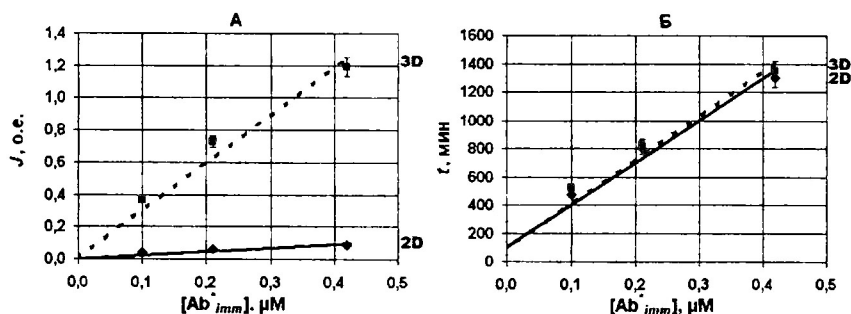


Рисунок 10. А. Равновесные уровни сигналов в зависимости от концентрации иммобилизуемых антител. Б. Время достижения насыщения в зависимости от концентрации иммобилизуемых антител. 3D – гидрогелевый микрочип, 2D – поверхностный микрочип.

Проигрешность 2D- в сравнении с 3D-микрочипами по уровням сигналов как и в случае сэндвич-иммуноанализа, видимо, следует приписать частичной денатурации антител из-за контактов с гидрофобной поверхностью и пониженной эффективности иммобилизации.

Равенство характерных времен реакции образования комплекса антиген-антитело на 2D- и 3D-микрочипах заставляет сделать вывод о том, что лимитирующей стадией реакции является диффузия антигена в растворе. Стадия собственно связывания антигена 2D- и 3D-ячейках, занимает меньшее время, чем диффузионная «доставка» материала к ячейке.

Теоретическое описание кинетики связывания антигена из раствора с антителами, иммобилизованными в ячейках микрочипа.

Для описания кинетики связывания флуоресцентно-меченного антигена из раствора с антителами, иммобилизованными в ячейках микрочипа, мы адаптировали разработанную ранее (Livshits, Mirzabekov 1996; Sorokin et al. 2003) кинетическую теорию гибридизации на олигонуклеотидных микрочипах. Время достижения равновесия и интенсивность сигнала в равновесии выражаются через параметры задачи следующими соотношениями:

$$\tau = \tau_D \frac{K_{ass}}{1 + K_{ass} [Ag]}$$

$$J_{eq} = A [C]_{eq} = A [Ab] \frac{K_{ass} [Ag]}{1 + K_{ass} [Ag]}$$

Здесь $[Ag]$ - концентрация антигена, $[Ab]$ - концентрация иммобилизуемых антител, K_{ass} - (равновесная) константа ассоциации, τ_D - характерное время диффузии антигена, A - «аппаратная константа», связывающая интенсивность сигнала с концентрацией комплекса, $[C]_{eq}$ - концентрация комплекса антиген-антитело в равновесии.

В случае гидрогелевого микрочипа диффузионное характерное время τ_D может определяться не только «внешней» диффузией антигена к ячейке, но и «задержанной диффузией» внутри гелевой ячейки. Теоретически соотношение этих факторов зависит от соотношения коэффициентов диффузии вне и внутри ячейки и от размеров и формы ячейки. Приведенные выше экспериментальные факты (а также теоретические оценки) свидетельствуют о том, что в рассматриваемых условиях лимитирующей является «внешняя» диффузия, одинаковая для гелевых и для поверхностных микрочипов.

Эффект принудительного перемешивания раствора

Кинетика, лимитируемая диффузией антигена к ячейкам микрочипа, может быть ускорена принудительным перемешиванием раствора в реакционной камере. Возможности такой оптимизации кинетики мы исследовали, присоединив к камере перистальтический насос. Использовали гидрогелевый микрочип с антителами к инсулину. Следили за ходом связывания флуоресцентно-меченного инсулина в режиме свободной диффузии и при перемешивании раствора с помощью перистальтического насоса.

Интенсивность прокачивания жидкости перистальтическим насосом во всех экспериментах была одинакова (6 мл/мин).

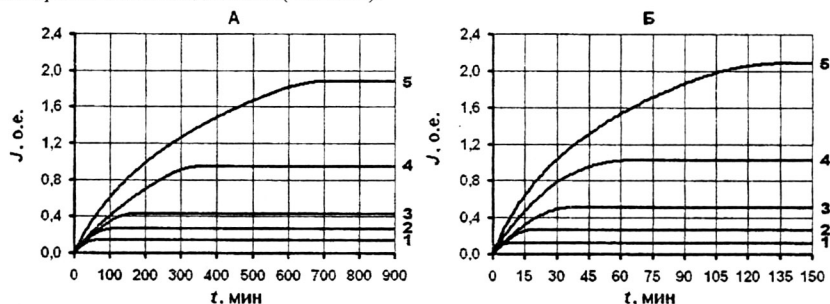


Рисунок 11. Кинетические кривые для диффузионно-реакционной кинетики (А) и кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б). Концентрация флуоресцентно-меченного инсулина в растворе $[Ag]_{sol} = 17$ нМ. Концентрации иммобилизованных антител: 0,2 мкМ (1), 0,5 мкМ (2), 1 мкМ (3), 2 мкМ (4), 4 мкМ (5)

Концентрационные зависимости уровней сигналов и характерных времен

Рис. 12 представляет наблюдаемые зависимости уровней сигналов в насыщении от концентраций иммобилизованных антител при различных концентрациях антигена (инсулина) в растворе. Экспериментальные данные (обозначены маркерами) очень хорошо укладываются в предсказанную теорией линейную зависимость.

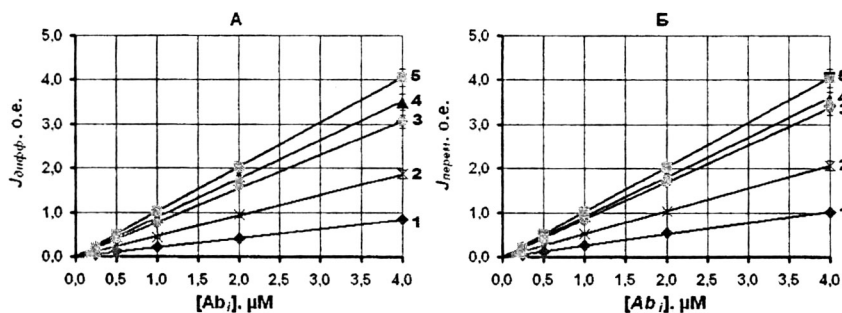


Рисунок 12. Зависимость интенсивности сигнала в насыщении от концентрации иммобилизованных антител для диффузионно-реакционной кинетики (А) и кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б). Концентрации антигена в растворе были соответственно равны: 5 нМ (1), 17 нМ (2), 50 нМ (3), 84 нМ (4), 168 нМ (5). Маркерами отмечены экспериментальные данные, сплошные линии соответствуют теоретически предсказанной зависимости.

Рисунок 13 представляет зависимость уровней сигналов в насыщении от концентрации антигена в растворе. Наблюдаемые нелинейные зависимости хорошо соответствуют предсказываемым теорией, как в случае диффузионно-реакционной кинетики, так и в случае кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса.

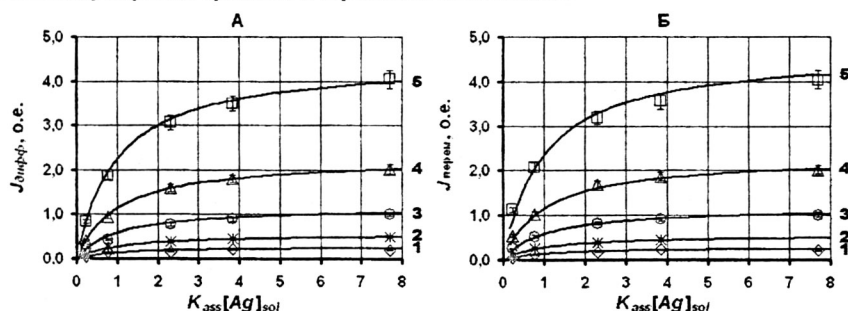


Рисунок 13. Зависимость интенсивности сигнала в насыщении от концентрации флуоресцентно-меченного антигена в растворе для диффузионно-реакционной кинетики (А) и кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б). Концентрации иммобилизованных антител были соответственно равны: 0,2 мкМ (1), 0,5 мкМ (2), 1 мкМ (3), 1 мкМ (4), 1 мкМ (5).

2 мкМ (4), 4 мкМ (5). Маркерами отмечены экспериментальные данные, линии соответствуют теоретически предсказанной зависимости.

Концентрационные зависимости характерного времени реакции представлены на рис 14, 15.

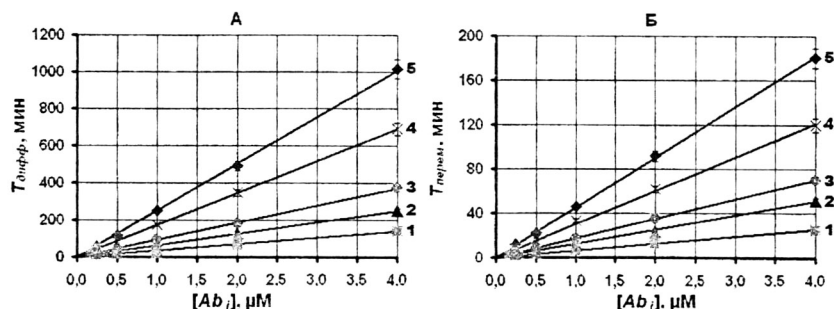


Рисунок 14. Зависимость времени достижения насыщения от концентрации иммобилизованных антител для диффузионно-реакционной кинетики (А) и для кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б). Концентрации антигена в растворе: 168 нМ (1), 84 нМ (2), 50 нМ (3), 17 нМ (4), 5 нМ (5). Маркерами отмечены экспериментальные данные, сплошные линии соответствуют теоретически предсказанной линейной зависимости.

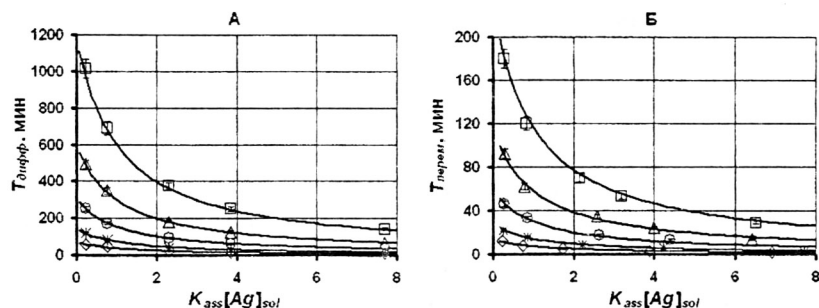


Рисунок 15. Зависимость времени достижения насыщения от концентрации флуоресцентно-меченного антигена в растворе для диффузионно-реакционной кинетики (А) и для кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б). Концентрации иммобилизованных антител: 0,2 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 4 мкМ. Маркерами отмечены экспериментальные данные, сплошные линии соответствуют теоретически предсказанной зависимости.

Наблюдаемые концентрационные зависимости очень хорошо соответствуют предсказанным теоретически. Принудительное перемешивание по-существу не меняет концентрационную зависимость времени достижения равновесия. Меняется лишь

коэффициент. Диффузионное характерное время τ_D заменяется на характерное время транспорта, ускоренного насосом, τ_P , которое в 4.5 раза меньше.

Наблюдаемое существенное сокращение характерного времени реакции (в 4,5 раза) означает, что перемешивание раствора обеспечивает преодоление лимитирующей стадии диффузионно-реакционной кинетики – стадии транспорта материала к месту связывания.

Влияние интенсивности перемешивания

Экспериментальное исследование, результаты которого представлены на рисунке 16, показало, что интенсивность перемешивания (скорость прокачивания раствора) влияет на время достижения равновесия, но не на равновесные уровни сигнала.

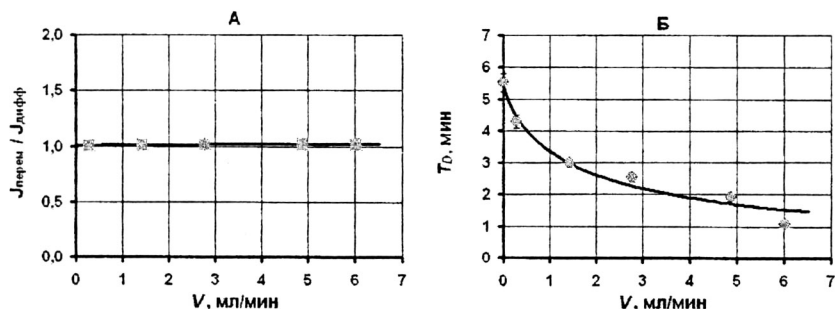


Рисунок 16. Зависимость отношения интенсивности сигнала от скорости перемешивания (А). Зависимость характеристического времени от скорости перемешивания (Б)

Перспективность применения перемешивания

Экспериментальное исследование эффектов принудительного перемешивания раствора с помощью перистальтического насоса в реакции антиген-антитело на гидрогелевых микроципах дало обнадеживающий результат: 4.5-кратное ускорение. Вместе с тем перемешивающее устройство на основе перистальтического насоса обладает рядом весьма неудобных особенностей, делающих его малоперспективным для широкого практического использования: оно громоздко, требует специальной реакционной камеры, нуждается в большом количестве исследуемого раствора. В качестве альтернативы мы исследовали компактное устройство – генератор ультразвуковых волн особой конфигурации, выпускаемый фирмой Advantix

Для сравнения эффективности двух систем перемешивания был использован микрочип с иммобилизованными антителами против ПСА. Были исследованы три варианта кинетики реакции антиген-антитело на микроципах: в условиях свободной диффузии, с

использованием перемешивания перистальтическим насосом и с перемешиванием ультразвуком. Результаты представлены на Рис 17.

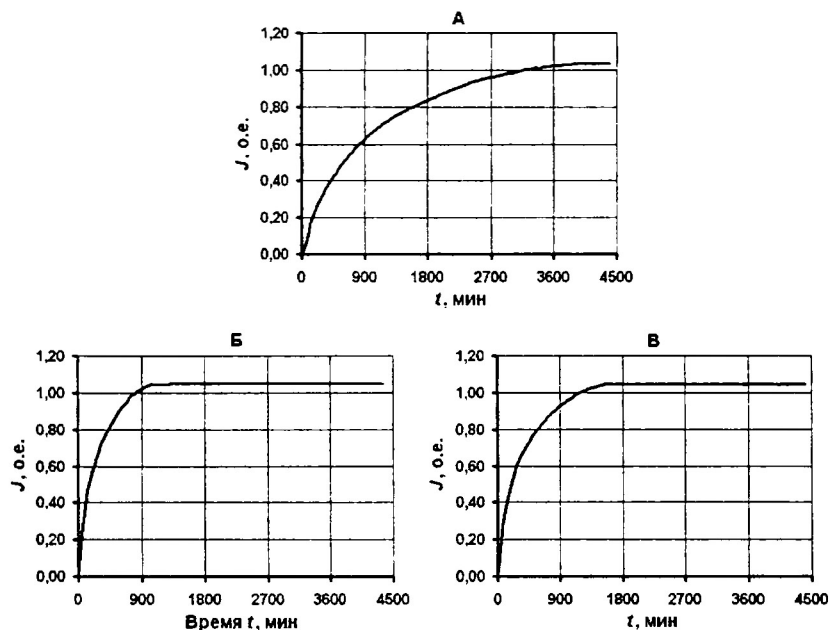


Рисунок 17. Кинетические кривые для диффузионно-реакционной кинетики (А), кинетики, ускоренной при помощи перистальтического насоса (Б) и кинетики, ускоренной при помощи ультразвука (В). Концентрация флуоресцентно-меченного антигена в растворе 17 нМ. Концентрация иммобилизованных антител 5,36 мкМ.

Как видно из графиков, два способа перемешивания реакционной смеси приблизительно одинаково эффективны в ускорении реакции на микрочипе. Время достижения насыщения при перемешивании с помощью перистальтического насоса сокращается в 4.5 раза, а при использовании прибора фирмы Advantix – в 4 раза. При столь незначительной разнице в эффективности ускорения, эксплуатационные достоинства прибора Advantix делают его явно предпочтительным.

Мы проверили эффективность применения ультразвукового перемешивающего устройства Advantix не только в условиях прямого иммуноанализа, но также и в условиях сэндвич-иммуноанализа. При выполнении этой задачи был использован микрочип для ранней и дифференциальной диагностики рака предстательной железы. Кинетические

измерения проводили в стандартных условиях одностадийного сэндвич-иммуноанализа на микрочипах.

Из графиков рисунке 18 видно, что перемешивание ультразвуком сокращает время насыщения сигнала от тройного комплекса при одностадийном сэндвич-иммуноанализе приблизительно в 4 раза, т.е. так же эффективно, как и при прямом иммуноанализе, когда флуоресцентно-меченный антиген образует бинарный комплекс с иммобилизованными аггителами.

Ультразвуковое перемешивающее устройство Advalytix представляется перспективным для ускорения процедур диагностики на микрочипах.

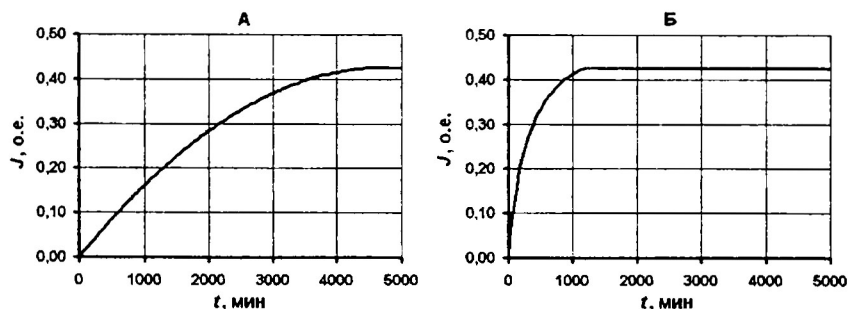


Рисунок 18. Кинетические кривые для диффузионно-реакционной кинетики сэндвич-иммуноанализа (А) и кинетики, ускоренной при помощи ультразвука (Б). Концентрация флуоресцентно-меченного антигена в растворе 17 нМ. Концентрация иммобилизованных антител 5,36 мкМ.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально установлены преимущества белковых микрочипов, использующих объемную иммобилизацию в гелевых ячейках, по отношению к микрочипам с поверхностной иммобилизацией. Иммобилизация в геле позволяет с сохранением нативности белка получать на порядки более высокие плотности молекул в расчете на единицу площади и иметь соответственно более высокие уровни сигналов.
2. В типичных условиях иммуноанализа на микрочипах кинетика лимитируется «внешней» диффузией антигена к ячейкам микрочипа и потому одинакова на 3D и 2D микрочипах. Наблюдаемые прямая зависимость времени реакции от количества иммобилизуемых антител и обратная зависимость от концентрации антигена соответствуют теоретически ожидаемым.
3. Принудительное перемешивание образца на микрочипе позволяет ускорить реакцию, т.е. сократить время анализа в 4-4.5 раза, что весьма важно для практического применения микрочипов.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **D.A. Zubtsov**, E.N. Savvateeva, A.Yu. Rubina, S.V. Pan'kov, E.V. Konovalova, O.V. Moiseeva, V.R. Chechetkin, A.S. Zasedatelev. Comparison of surface and hydrogel-based protein microchips. //Analytical Biochemistry 368(2):205-13 (2007)
2. **D.A. Zubtsov**, S.M. Ivanov, A.Yu. Rubina, E.I. Dementieva, V.R. Chechetkin, A.S. Zasedatelev. Effect of mixing on reaction-diffusion kinetics for protein hydrogel-based microchips. //Journal of Biotechnology 122: 16-27 (2006).
3. V.I. Dyukova, E.I. Dementieva, **D.A. Zubtsov**, O.E. Galanina, N.V. Bovin, A.Yu. Rubina. Hydrogel glycan microarrays //Analytical Biochemistry 347: 94–105(2005)

Зубцов Дмитрий Александрович

Кинетика образования комплекса антиген-антитело на микрочипах

Подписано в печать 02.10.2008. Формат 60х84 1/16. Печать офсетная.
Усл.печ.л 1,0. Уч.-изд.л 1,0 Тираж 100 экз. Заказ № 912

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Московский физико-технический институт (государственный университет)
Отдел автоматизированных издательских систем "ФИЗТЕХ-ПОЛИГРАФ"
141700, Моск. обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

